



УКРАЇНА

(19) UA (11) 46451 (13) U  
(51) МПК (2009)  
C12N 5/00МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ  
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ  
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ  
ВЛАСНОСТІОПИС  
ДО ПАТЕНТУ  
НА КОРИСНУ МОДЕЛЬвидається під  
відповідальність  
власника  
патенту

## (54) СПОСІБ ПІДВИЩЕННЯ ЯКОСТІ ЕМБРІОНІВ ЛЮДИНИ

1

2

(21) u200906110

(22) 15.06.2009

(24) 25.12.2009

(46) 25.12.2009, Бюл.№ 24, 2009 р.

(72) ГРИЩЕНКО ВАЛЕНТИН ІВАНОВИЧ, ПІНЯЄВ  
ВОЛОДИМИР ІВАНОВИЧ, ПЕТРУШКО МАРИНА  
ПАВЛІВНА, ЧУБ НАТАЛІЯ НЕСТЕРІВНА, ДОБРУ-  
НОВА ІННА ВОЛОДИМИРІВНА(73) ІНСТИТУТ ПРОБЛЕМ КРІОБІОЛОГІЇ І КРІО-  
МЕДИЦИНИ НАЦІОНАЛЬНОЇ АКАДЕМІЇ НАУК  
УКРАЇНИ(57) Спосіб підвищення якості ембріонів людини,  
що включає забір біоматеріалу, його культивуван-  
ня до утворення моношару і поміщення на нього  
ембріонів для співкультивування, який **відрізня-**  
**ється** тим, що як біоматеріал для співкультиву-  
вання використовують кріоконсервовані клітини  
гранульози і кумулюса.

Корисна модель належить до репродуктивної медицини і може бути використана для підвищення ефективності методів екстракорпорального запліднення *in vitro* (ЗІВ).

Важливим є питання розвитку та реабілітації ембріонів людини в програмі ЗІВ і після процесу кріоконсервування, тому існує необхідність використання при культивуванні біологічно активних речовин, які сприяють розвитку ембріонів *in vitro*.

При лікуванні безпліддя методом ЗІВ ембріони за звичаєм переносять до порожнини матки на стадії 4-8 бластомерів на 2-3 день після запліднення ооцита. Такий ранній перенос ембріонів і пов'язана з цим асинхронність процесів *in vivo* та *in vitro* викликані недостатнім розвитком і низьким рівнем виживання ембріонів людини при пролонгованому культивуванні. Причиною зниження виживання ембріонів є те, що культивування здійснюються в синтетичних середовищах. При такому способі культивування всього 25-30% ембріонів спроможні сформувати бластоцисту.

Первісно системи співкультивування були розроблені для подолання зупинки (блока) ембріонального розвитку, яка спостерігається при культивуванні *in vitro*. Відомо, що культивування ранніх ембріонів людини на моношарі клітин поліпшує їх передтрансплантаційний розвиток і збільшує процент формування бластоцист і частоту імплантації після переносу ембріонів до порожнини матки.

Відомий спосіб підвищення якості ембріонів людини шляхом попереднього їх культивування на моношарі епітеліальних клітин яйцеводу вівці [1].

Недоліком даного способу є те, що джерелом

клітин, що використовуються для культивування, є тваринний об'єкт, у зв'язку з чим підвищується ризик бактеріального і вірусного інфікування ембріонів, при цьому тільки 58,5% ембріонів розвиваються *in vitro* до стадії бластоцисти. Крім того, необхідні додаткові витрати для обстеження гетерологічних ліній клітин щодо інфекційних захворювань.

Відомий спосіб підвищення якості деконсервованих ембріонів, в якому на етапі культивування ембріонів в середовище культивування додають 10% фолікулярну рідину [2].

Недоліком цього способу є те, що разом з фолікулярною рідиною в середовище культивування ембріонів попадають еритроцити, які негативно впливають на ембріони, а саме, підвищується частота фрагментації ембріонів і зменшується до 50% кількість ембріонів, що розвиваються до стадії бластоцисти.

Найбільш близьким до заявленого за своєю суттю є спосіб підвищення якості ембріонів людини, який полягає в тому, що перед програмою ЕКЗ у пацієнтки в менструальному циклі одержують ендометріальні епітеліальні клітини і культивують на прийнятому для даної культури середовищі. Після культивування на утворений моношар поміщають ембріони і співкультивують протягом 3-4 діб до розвитку бластоцисти [3].

Основним недоліком даного способу є те, що він не забезпечує одержання високої якості ембріонів. Тільки 61,2% ембріонів розвивається до стадії бластоцисти. Крім того, спосіб є досить складним і травматичним для пацієнтки, тому що

(13) U

(11) 46451

(19) UA

одержання ендометріальних епітеліальних клітин здійснюється шляхом біопсії ендометрію.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити такий спосіб підвищення якості ембріонів людини, в якому б, шляхом заміни біоматеріалу, що використовується для співкультивування з ембріонами, забезпечувалась можливість підвищити якість ембріонів і, тим самим, збільшити кількість ембріонів, що розвинулись до стадії бластоцисти.

Ця задача вирішується тим, що в способі підвищення якості ембріонів людини, який включає забір біоматеріалу, його культивування до утворення моношару і поміщення на нього ембріонів для співкультивування, згідно з корисною моделлю, як біоматеріал для співкультивування використовують кріоконсервовані клітини гранульози і кумулюса (КГК).

Спільне культивування ембріонів с КГК забезпечує підвищення якості ембріонів, про що свідчить збільшення кількості ембріонів, розвинутих до стадії бластоцисти.

В Таблиці наведені дані, які указують на те, що після співкультивування з КГК (№4, 5) кількість ембріонів, що досягли стадії бластоцисти, вища ніж після співкультивування з іншими біоматеріалами (№1, 2, 3). У порівнянні з прототипом (№3) кількість нативних ембріонів, що досягли стадії бластоцисти, підвищується майже на 30%, кріоконсервованих - на 25%. При цьому спосіб нескладний і дозволяє знизити ризик фізичного і психологічного травмування пацієнтки.

Спосіб здійснюють таким чином.

Під час проведення програми ЗІВ, шляхом аспірації фолікулів, одержують фолікулярну рідину з ооцит-кумулюсним комплексом і виділяють клітини КГК. Відмиті від крові клітини КГК помішують в середовище культивування і культивують у CO<sub>2</sub>-

інкубаторі при 37°C. Утворений моношар клітин переносять до пластикових віол з розчином кріопротектору і витримують 30хв в парах азоту, далі занурюють у рідкий азот. Розморозжують КГК на водяній бані при 37°C і культивують протягом 24 годин. Після культивування нативні або кріоконсервовані ембріони поміщують на утворений моношар і співкультивують с КГК до утворення бластоцисти.

Приклад.

Під час проведення програми ЗІВ, шляхом аспірації фолікулів, одержували фолікулярну рідину. Після виділення ооцит-кумулюсного комплексу препаратом гілкою відрізали частинки розміром 10-20мкл і ресуспендували в середовищі культивування Meneso B2. Відмивали в цьому ж середовищі для видалення еритроцитів. Після відмивання КГК помішували в чашки Петрі (D=30мм) із середовищем Meneso B2 і переносили до CO<sub>2</sub>-інкубатора, де культивували при 37°C протягом 24 годин. На цей час на дні культуральних чашок відмічалися адгезія і розростання КГК з утворенням моношару. Моношар відділяли пастеровською піпеткою і поміщали у 1мл пластикові віоли з розчином кріопротектору (1М розчин 1,2-пропандіолу, 0,5М розчин сахарози). Віоли витримували 30хв в парах азоту, після чого занурювали у рідкий азот. За день до початку проведення співкультивування ембріонів з КГК віолу з КГК розморозжували на водяній бані при 37°C, культуру триразово відмивали від розчину кріопротектору в середовищі Meneso B2 і поміщали в чашки Петрі з 3мл середовища Meneso B2, куди далі переносили нативні або кріоконсервовані ембріони. Співкультивування ембріонів з КГК здійснювали в CO<sub>2</sub>-інкубаторі до утворення бластоцист. Результати наведені в Таблиці (№ 4, 5).

Таблица

Порівняльний аналіз розвитку ембріонів in vitro до стадії бластоцисти із застосуванням різних систем співкультивування

№№ п/п	Системи співкультивування	Кількість ембріонів, що досягли стадії бластоцисти
1	Епітеліальні клітини яйцеводу вівці	58,5*
2	10% фолікулярна рідина	50,0*
3	Епітеліальні клітини ендометрію	61,2*
4	Клітини КГК для нативних ембріонів (n=15)	92,2±8,5
5	Клітини КГК для кріоконсервованих ембріонів (n=10)	86,4±8,2

\*дані авторів

Джерела інформації:

1. Wiemer K., Hoffman D., Macson W. Embryonic morphology and rate of implantation of human embryos following co-culture on bovine oviductal epithelial cells // Hum. Rep. - Vol.8, №1, P.97-101.

2. Hemmings R., Lachapelle M., Falcone T. et al. / Effect of follicular fluid supplementation on in vitro

development of human pre-embryos // Fertil. & Steril. - 1994. - Vol.62, №5. - P.1018-1021.

3. Simon C, Mercades A., Velasco J. Coculture of human embryos with autologous human endometrial cells in patients with implantation failure // The J. of Clinical Endocrin. & Metabolism. - 1999. - Vol.84, №8. - P.2638-2646 (прототип).

